

河川水中の変異原物質の分離・精製とその構造決定

Isolation and Chemical Structural Determination of
Mutagenic Substances in River Water

	教養・基礎教育	大場 浩
京都薬科大学	公衆衛生学教室	渡辺 徹志
静岡県立大学薬学部	薬品資源学教室	糠谷 東雄

【要旨】

前報で、浜松市の或る河川水中にかなり強い変異原物質の存在を認めたことから、今回その化学構造を明らかにする目的で分離と精製を行ったところ、フェニルベンゾトリアゾール系化合物の一種で、強い変異原性を示す物質の化学構造を明らかにすることができたので報告する。なお、この物質以外にも変異原性を示す類似化合物の存在が確認された。

キーワード：河川水中、変異原物質、化学構造の解明

I. はじめに

水中の変異原物質の有無やその強さを水質汚染の質的指標の一つと考え、以前より浜松市およびその近郊の河川水中の変異原物質について調査研究を実施している。浜松市内の河川は、浜名湖、佐鳴湖および遠州灘のいずれかに流れ出ているが、それらの河川へは、生活排水のほか、染色工場などからの排水も流れ込んでおり、今後は特に、質的な面からの水質汚染には注意を払う必要がある。

前報¹⁾で、浜松市内の或る河川水中に強い変異原活性を示す物質の存在を認めたが、量的に少量のために、その化学構造を解明できなかった。その後の予備実験で、その河川水中の変異原物質は、1種類ではなく、数種類存在することが明らかとなった。そこで今回、河川水中の変異原物質などを特異的に吸着する吸着材、ブルーレイオンを用いて変異原物質を吸着させ、²⁾ Sephadex LH-20、HPLC などの分離精製方法³⁾ を組み合わせた結果、それらの変異原物質の一つの化学構造を解明できたので、以下に報告する。

II. 実験方法

1. ブルーレイオンによる河川水中の変異原物質の吸着と抽出

対象の河川水中にブルーレイオン 100 g を一昼夜放置して、変異原物質を吸着させたのち回収し、蒸留水で十分洗浄し、40℃で乾燥させた。ついでメタノール：アンモニア (50:1) 溶液にてブルーレイオン吸着物質を抽出し、抽出液を40℃水浴上、ロータリーエバポレーターにて減圧濃縮し、抽出物質 142 mg を得た。

2. Sephadex LH-20 による変異原物質の分離精製

第1回目の分離精製は、Sephadex LH-20 を分離用ガラスカラム ($\phi 3.0 \times 48$ cm) につめ、少量のメタノールに溶かしたブルーレイオン抽出物 82mg をカラム上にのせ、メタノールを溶出液として Kd 値に従って各分画に分けた。その結果、得られた変異原活性の最も強い分画 (Fraction 5) について、さらに再度 Sephadex LH-20 による精製を行った。

3. YMC-Pack ODS-AM カラムを用いた HPLC による分離精製

2回の Sephadex LH-20 による分離後、変異活性の最も強い Fraction 5-(6) について YMC-Pack ODS-AM324 カラムを用いた HPLC による分離精製を行うと共に、各 Fraction について変異原性試験を行った。なお分離条件は、Fig. 1 に記載した。

4. Phenyl-Hexyl カラムを用いた HPLC による分離精製

ODS-AM324 カラムによる HPLC の分離結果から、最も変異原活性の強い Fr. 21 について、さらに Luna 5 μ Phenyl-Hexyl カラムによる HPLC での分離精製を行った。分析チャートを、分析条件と共に Fig. 2 に、各 Fraction の変異原活性を Fig. 3 に示した。

5. ESI-MS スペクトルおよび UV スペクトルの測定

強い変異原活性を示した Fr. 21- (46) について質量分析および紫外-可視吸収スペクトルを測定した。質量分析計は、Water 製エレクトロスプレーイオン化シングル四重極質量分析計を用い、cone voltage 40V で測定し、紫外-可視吸収スペクトルは、島津製作所フォトダイオードアレイ検出器を用い、アセトニトリル-水混合溶液中で測定した。

6. 変異原性試験

前報で、対象の河川水中の変異原物質は、サルモネラ TA100 菌株と TA98 菌株では、TA98 にのみ変異活性を示したので、今回その改良菌株である YG1024 菌株を用い、S9 mix 存在下で Ames 試験⁴⁾を行い、各 Fraction における変異原活性はプレート当たり、または各 Fraction 当たりの復帰突然変異コロニー数、すなわち revertants で示した。

III. 実験結果

1. ブルーレイオン吸着物質の分離精製過程における変異原活性

Table 1 に第1回目の Sephadex LH-20 による分離精製で得られた各 Fraction の流出重量と YG1024 株に対する変異原活性を示し、Table 2 は Table 1 の結果で最も強い変異原活性を示した Fraction 5 について、第2回目の Sephadex LH-20 による分離

を実施した結果を同様に示した。

Table 1. Isolation of Blue Rayon Adsorbate by SephadexLH-20 Chromatogram and Mutagenicity to *S. typhimurium* YG1024 of Each Fraction

Fraction (No)	Kd value	Weight (mg/fraction)	Mutagenicity (revertants /0.1mg/plate)
1	0~0.8	3.6	13
2	0.8~1.0	7.4	62
3	1.0~1.3	18.2	69
4	1.3~1.5	16.9	686
5	1.5~2.0	12.1	1000<
6	2.0~3.0	18.5	897
7	3.0~3.6	3.0	56

Table 2. Isolation of Fraction 5 by SephadexLH-20 Chromatogram and Mutagenicity of Each Fraction

Fraction (No)	Kd value	Weight (mg/fraction)	Mutagenicity (revertants/7 μ g/plate)
5-(1)	0~0.66	0.1	13
5-(2)	0.66~0.88	0.9	19
5-(3)	0.88~1.07	1.5	35
5-(4)	1.07~1.26	1.1	22
5-(5)	1.26~1.50	2.5	70
5-(6)	1.50~2.75	4.2	514

2. YMC-Pack ODS カラムでの HPLC による分離と変異原活性

2回の SephadexLH-20 カラムクロマトグラフィーの分離精製で得られた、Fraction 5-(6)は変異原活性が最も高いことから、さらに分離精製を目的にこの分画 3.6 mg を YMC-Pack ODS-AM カラムを用いた HPLC による分離精製を行い、溶出液を1分毎に分画し、画分の変異原活性を試験し、その結果を Fig.1 に示した。

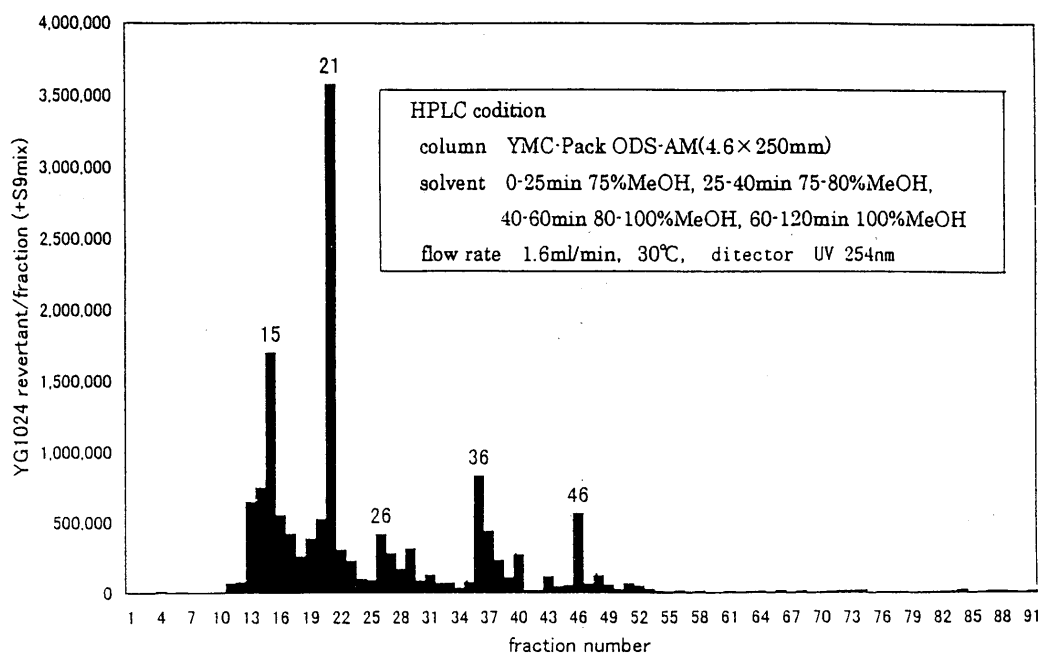


Fig. 1. Isolation of Fraction 5-(6) by HPLC(YMC-Pack ODS-AM) and Mutagenicity of Each Fraction

3. Phenyl-Hexyl カラムを用いた HPLC による分離精製と変異原活性

YMC-Pack ODS-AM HPLC カラムで得られた Fraction 21 をさらに、UV 254nm を ditector として Phenyl-Hexyl カラムを用いた HPLC による精製を実施し、その時の溶出ピークと保持時間を Fig. 2 に示し、各 Fraction の変異原活性を Fig. 3 に示した。

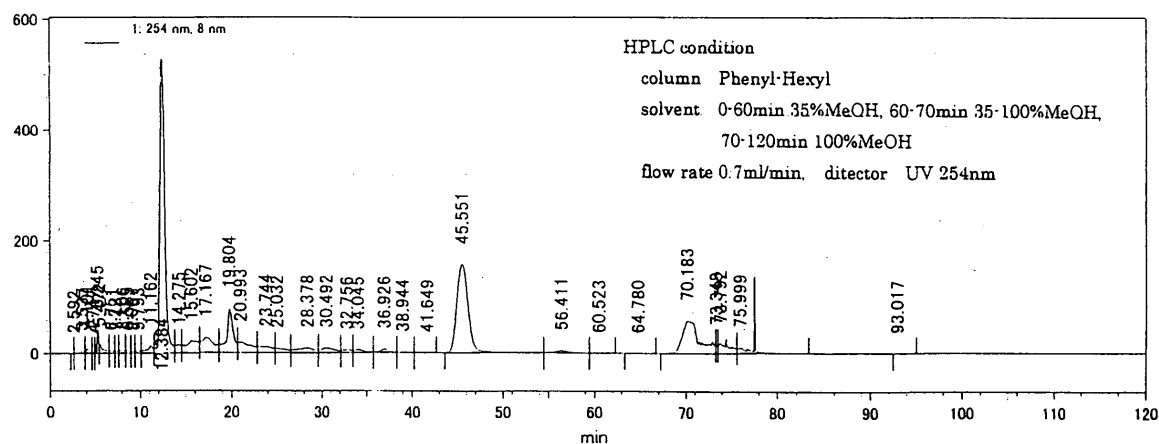


Fig. 2. HPLC(Phenyl-Hexyl) Chart of Fraction 21

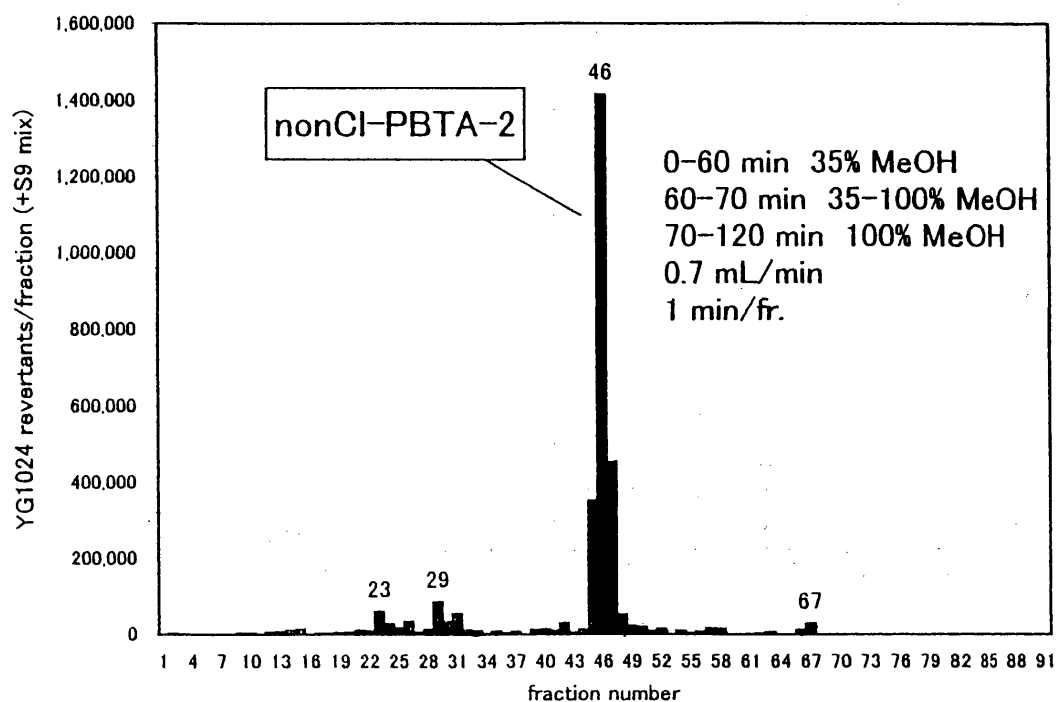


Fig. 3. Isolation of Fraction 21 and Mutagenicity of Each Fraction by HPLC(Phenyl-Hexyl)

4. Fraction 21-(46)のESI-MS スペクトルおよびUV スペクトル

Phenyl-Hexyl HPLC で得られた Fraction 21-(46)は単一のピークを示したことから、この分画は単一化合物よりなると判断し、UV スペクトルおよびESI-MS スペクトルを測定し、それぞれFig. 4およびFig.5に示した。

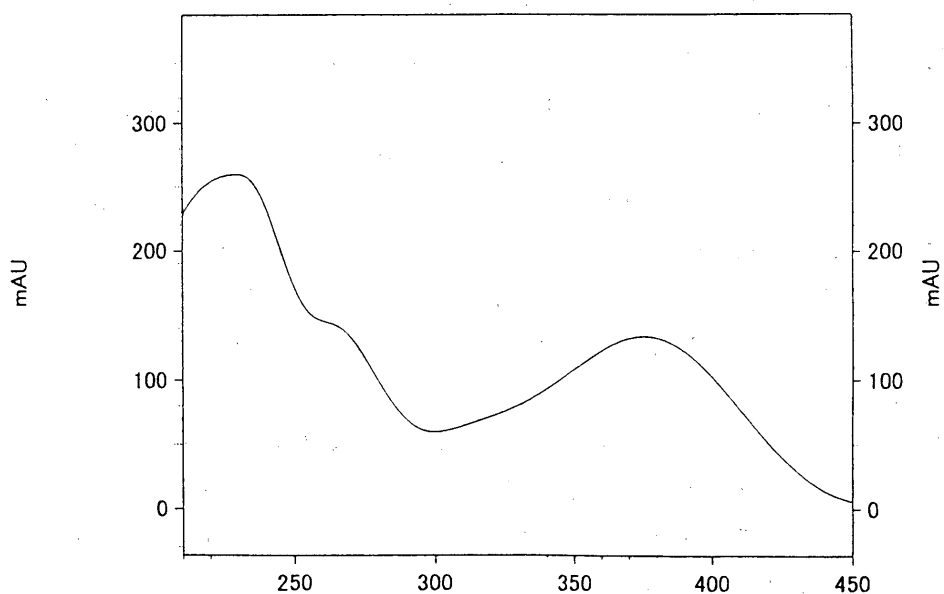


Fig. 4. UV Absorption Spectrum of Fraction 21-(46)

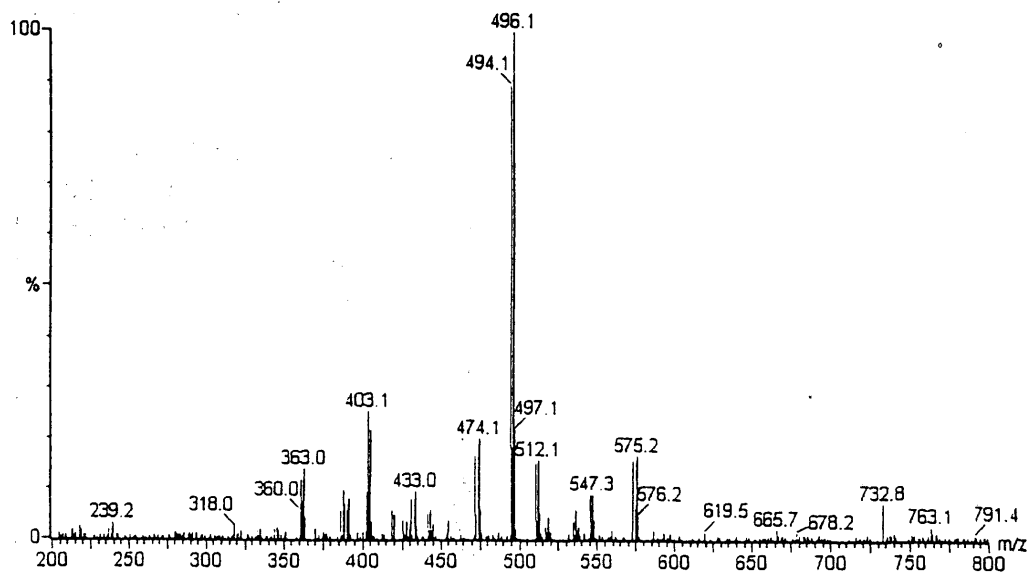


Fig. 5. ESI-MS spectrum of Fraction 21-(46)

IV. 考察

ブルーレイオン吸着物質のメタノールとアンモニア混液抽出物を2回の Sephadex LH-20 カラムクロマトグラフィーによる分離、ついで HPLC (YMC-Pack ODS-AM) で分離精製した結果、Fig. 1 に示したように、変異原活性が比較的高い3~4個の Fraction が認められた。その中で、最も変異原活性が高く、量的にも多い Fraction 21 について、さらに Penyl-Hexyl HPLC での分離精製を行った。その結果 Fig. 2 に示すように、保持時間 45.551 分に単一なピークが得られ、さらにこのピークに相当する Fraction 21-(46) の変異原活性は、Fig. 3 に示すように高い値を示すことが判明した。そこでこの Fraction 21-(46) を変異原性の単一化合物であると判断し、まず UV スペクトルを測定した結果、以前京都などの河川水中で検出されているフェニルベンゾトリアゾール (以下 PBTA と略す) 系化合物の一種と類似した UV スペクトルを示した。また LC/MS スペクトルにおいて、 m/z が 472 [M+H]⁺、494 [M+Na]⁺ のピークと、それぞれの同位体のピーク (m/z 474 と 496) の存在が認められ、これらは、non Cl-PBTA-2 として標品化されている Fig. 6 に示した化合物と一致し、さらに同標品と Phenyl-Hexyl HPLC による保持時間、UV スペクトルの結果が一致したことから、Fraction 21-(46) の物質を 2-[2-(アセチルアミノ)-4-[N-(2-シアノエチル)エチルアミノ]-5-メキシフェニル]-5-アミノ-7-プロモ-2H-ベンゾトリアゾール (以下 non Cl-PBTA-2 と略す) と同定した。

同定された、non Cl-PBTA-2 について、渡辺ら⁵⁾ は、繊維染色用として市販されているアゾ染料が、ハイドロサルファイト等で還元されて生成する物質であると推定されることを報告している。また、この化合物について S9 mix 存在下でのサルモネラ TA98 株に対する変異原性は、37000 revertants/ μ g と高く、さらに渡辺らはこの化合物が塩素化されて、Fig. 6 の化学構造のフェニルベンゾトリアゾール環の4位に塩素原子がはいると変異原活性はさらに約2.5倍高くなることも報告している。

今回、YMC-Pack ODS-HPLC で分離された、Fraction 21 以外の Fraction 15 などについて現在その物質の同定を検討中であり、さらに、今後この物質の自然界での安定性や変化など、この化合物の消長についても、対象河川の下流の底質土壌などを採取するなどして検討したいと考えている。

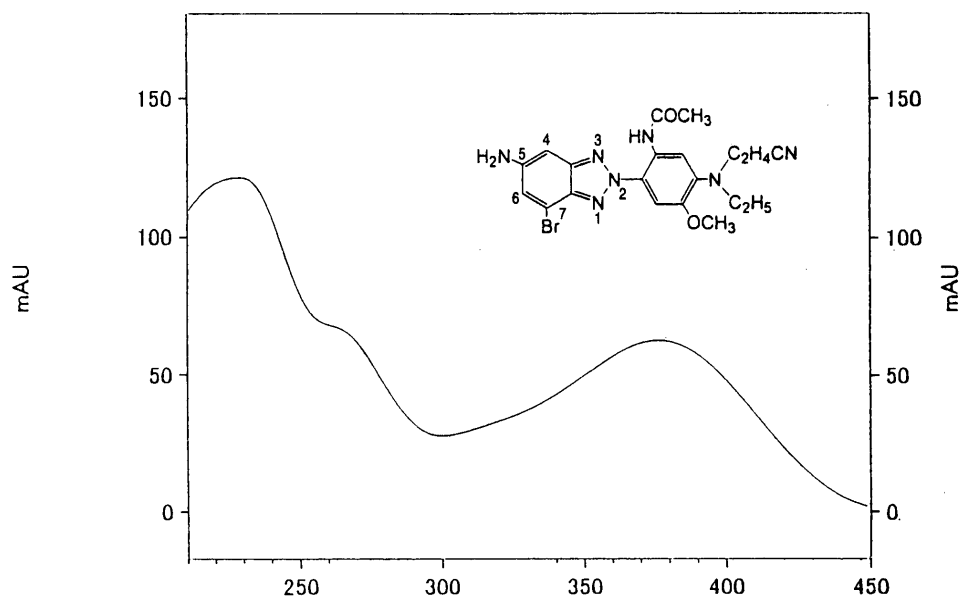


Fig.6. Chemical structure and UV spectrum of non C1-PBTA-2

V. まとめ

1. 浜松市内の河川水中から、Sephadex LH-20、HPLC による分離・精製を繰り返すことによって、高い変異原活性を有する物質を単離し、同定できた。
2. 同定された化合物は、HPLC の保持時間、UV スペクトルおよび LC/MS スペクトルから、フェニルベンゾトリアゾール環を有する、2-[2-(アセチルアミノ)-4-[N-(2-シアチル)エチル]エチルアミノ]-5-メトキシフェニル]-5-アミノ-7-プロモ-2H-ベンゾトリアゾールであることが判明した。
3. この物質は、高い変異原活性があり、市販されているアゾ染料が、還元、環化されて生成したものと考えられる。
4. この物質以外に、3~4 種の変異原物質の存在が確認された。

VI. 謝辞

今回の化学構造決定にあたり、LC/MS スペクトル分析をして頂いた、国立がんセンター研究所の高村岳樹氏、ならびに、YG1024 菌株を供与して頂いた国立医薬品食品衛生研究所、変異遺伝部の能美健彦氏に深謝致します。

VII. 引用文献

- 1) 大場 浩：浜松市とその近郊の河川水中の変異原物質の検索, 聖隷学園浜松衛生短期大学紀要, 第21号, P1~6(1998).
- 2) 坂本 博、早津彦哉：ブルーレイオンを用いた河川水の変異原性モニタリング法, 環境変異原研究, Vol. 12, P41~45(1990).
- 3) 糠谷東雄他：河川水中の変異原物質の検索, 環境変異原研究, Vol. 21(2), P153~157(1999).
- 4) Masahiko Watanabe et al. : Sensitive method for the detection of mutagenic nitroarenes and aromatic amines : new derivatives of *Salmonella typhimurium* tester strains possessing elevated *O*-acetyltransferase levels, Mutation Research, Vol. 234, P337~348(1990).
- 5) Atsuko Oguri et al. : Identification of a 2-phenylbenzotriazole(PBTA)-type mutagen, PBTA-2, in water from the Nishitakase River in Kyoto, Chem. Res. Toxicol., Vol. 11, P1195~1200(1998).

VIII. 参考文献

- 1) Haruo Nukaya et al. : Isolation and Chemical-Structural Determination of a Novel Aromatic Amine Mutagen in Water from the Nishitakase River in Kyoto, Chem. Res. Toxicol., Vol. 10(10), P1061~1066(1997).
- 2) 佐々木裕子他：河川の変異原性とその原因物質の検索について, Environ. Mutagen. Res., Vol. 18, P21~27(1996).
- 3) Tatsushi Shiozawa et al. : Chemical Synthesis of a Novel Amine Mutagen Isolated from Water of the Nishitakase River in Kyoto and a Possible Route of Its Formation, Chem. Res. Toxicol., Vol. 11(4), P375~380(1998).